

STIC-ILL

NO

409001

Fr m: Steadman, David (AU1652)
Sent: Tuesday, August 20, 2002 1:10 PM
To: STIC-ILL
Subject: literature request for 09/815,533

Art Unit: 1652
Office: 10D-04
Mailbox: 10C-01 M3
Case Serial #:09/815,533

Please provide the following references:

- 1) J Chromatogr 1990 Feb 23;525(2):297-306
Purification of urokinase by combined cation exchanger and affinity chromatographic cartridges.
Hou KC, Zaniewski R.
- 2) Purification of high-molecular-weight and low-molecular-weight urokinase and kinetic study
Sun, Tian-Xiao; Wang, Hong-Mei; Xu, Chang-Fa
Shengwu Huaxue Zazhi (1997), 13(3), 344-349
- 3) Isolation, purification and comparative studies of certain properties of high- and low-molecular-weight urokinases of human urine.
Sun, Leqin; Zhang, Hongzu; Zhu, Dexu
Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao (1984), 16(3), 303-6
- 4) J Biochem (Tokyo) 1981 Jul;90(1):225-32
A comparative study of high molecular weight urokinase and low molecular weight urokinase.
Nobuhara M, Sakamaki M, Ohnishi H, Suzuki Y.
- 5) Enzyme 1981;26(4):221-4
Kinetic studies of three different molecular forms of urokinase for the activation of native human plasminogen.
Toki N, Takasugi S, Sumi H.
- 6) Thromb Haemost 1983 Apr 28;49(2):91-5
Purification of high molecular weight urokinase from human urine and comparative study of two active forms of urokinase.
Shibatani T, Kakimoto T, Chibata I.
- 7) Thromb Haemost 1982 Jun 28;47(3):197-202
Rapid isolation of high molecular weight urokinase from native human urine.
Huber K, Kirchheimer J, Binder BR.
- 8) Chem Pharm Bull (Tokyo) 1981 Feb;29(2):463-71
Comparative studies on two active enzyme forms of human urinary urokinase. I. Purification by serial column chromatography and homogeneity analyses of molecular weight and isoelectric point.
Miwa N, Takayanagi H, Suzuki A.

Thank you,
David J. Steadman
Art Unit 1652
CM1, 10D-04
308-3934

CAS
8/21

COMPLETED

PP 349

04348141X



7

第13卷第3期

1997年6月

生物化学杂志

Chinese Biochemical Journal

Vol. 13, No. 3

Jun., 1997

高分子量和低分子量尿激酶的分离纯化及动力学性质研究

孙天霄 王红梅 徐长法**

(北京大学蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室, 北京 100871)

摘要 人尿激酶粗品经苯甲脒亲和柱纯化和 Protein-Pak SP 柱分离后, 得到两种分子量的尿激酶(UK), 即高分子量尿激酶(HUK)和低分子量尿激酶(LUK). 采用考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度, 纤维蛋白平板法测定活力, 测得 HUK 比活为 2.9×10^5 IU/mg 蛋白, LUK 为 3.5×10^5 IU/mg 蛋白, 活力回收为 70% 以上. 经 SDS-PAGE 鉴定, HUK 和 LUK 均呈单一条带, 分子量分别为 54kD 和 33kD. HUK 和 LUK 水解显色底物 S_{2444} 的动力学常数, 分别测得 HUK 的 K_m 为 $64 \mu\text{mol/L}$, k_{cat} 为 15 s^{-1} , LUK 的 K_m 为 $49 \mu\text{mol/L}$, k_{cat} 为 13 s^{-1} , LUK 的催化效率(k_{cat}/K_m)稍高于 HUK.

关键词: 高分子量尿激酶, 低分子量尿激酶, 分离纯化, 米氏动力学

由血栓引起的心血管疾病是人类死亡的主要原因之一, 溶栓疗法是治疗此类疾病的有效手段. 尿激酶作为常用的溶栓药物之一, 挽救了许多心肌梗塞患者的生命. 它是一种纤溶酶原激活剂, 由肾小管上皮细胞产生并被分泌到尿中^[1,2]. 在临床用上, 尿激酶和链激酶相比毒副作用小、无抗原性等, 因而曾被广泛地应用于急性心肌梗塞、脑血栓、外周动脉血栓和视网膜动/静脉血栓等疾病的治疗^[3], 目前主要用于急性心肌梗塞的治疗. 天然尿激酶存在多种形式, 主要为 54kD 的 HUK 及 33kD 的 LUK. HUK 在体内的半衰期较长, 与 LUK 相比具有较小的出血倾向^[4], 因此在美国 FDA 及欧州药典 EP 都明确规定尿激酶制剂中, HUK 的含量必须大于 90%. 尿激酶的纯化, 除了使用传统的层析方法, 还常采用亲和层析的方法, 使用的配基有螯合锌离子、精氨酸、苯甲脒、单克隆抗体等^[5]. 仅一步亲和层析很难将 HUK 和 LUK 完全分开, 还需要使用其它的层析方法. 本文采用苯甲脒亲和层析和 SP 离子交换层析两个步骤分离纯化 HUK 和 LUK, 纯化步骤简单, 效率较高. 同时采用 Marquardt-Levenberg 迭代算法测定了 HUK 和 LUK 的米氏动力学参数.

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂 苯甲脒-Sepharose 6B(Pharmacia 公司); Sephadex G-25(上海化学试剂厂进口分装); Protein-Pak SP 柱(Waters 公司); 考马斯亮蓝 G-250 和 N,N'-甲叉双丙烯酰胺(Fluka 公司); Tween 80(Gibco/BRL 公司); 十二烷基硫酸钠(SDS)(Serva 公司); 尿激酶粗品

• 国家 863 计划资助项目(863-103-21-02)

** 通讯联系人

收稿日期: 1996-05-01, 修回日期: 1996-08-02

(上海生化制药厂); S_{2444} (pyro-Glu-Gly-Arg-*p*-nitroanilide) (Sigma 公司); UK 标准品, 凝血酶和纤维蛋白原(中国药品生物制品检定所); 低分子量标准蛋白质(上海东风生化试剂厂); 其余试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 尿激酶活力的测定 采用纤维蛋白平板法^[6]。

1.3 蛋白质浓度的测定 采用考马斯亮蓝法^[7]以牛血清白蛋白为标准。

1.4 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 参照 Laemmli 的方法^[8]进行。

1.5 苯甲脒-Sepharose 6B 亲和柱纯化 UK 起始缓冲液为 0.1 mol/L NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 , 0.4 mol/L NaCl, pH7.0, 洗脱缓冲液为 0.1 mol/L NaAc-HAc, 0.4 mol/L NaCl, pH4.0。尿激酶粗品溶于蒸馏水中, 于台式冷冻离心机 4℃, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清对起始缓冲液彻底透析; 样品上柱前用 0.45 μm 滤膜过滤。苯甲脒-Sepharose 6B 柱(10×150 mm)用 5 倍柱体积起始缓冲液平衡, 流速 12 ml/h。处理后的样品以同一速度上样。上样完成后, 再用 5 倍柱体积起始缓冲液平衡。用洗脱缓冲液进行洗脱, 分部收集。

1.6 Protein-Pak SP 柱分离 HUK 和 LUK 缓冲液 A 为 0.1 mol/L NaAc-HAc, pH5.0, 缓冲液 B 为缓冲液 A+1mol/L NaCl。Sephadex G-25 柱(30×200 mm)用缓冲液 A 平衡后, 经苯甲脒柱纯化的 UK 样品上 Sephadex G-25 柱脱盐。Protein-Pak SP 柱(10×100mm)用缓冲液 A 以 1ml/min 流速平衡至基线稳定。经脱盐处理的样品上柱后用缓冲液 A 平衡至基线稳定。用缓冲液 B 进行线性梯度洗脱, 240min, 缓冲液 B 从 0% 到 50%, 洗脱液按活性峰收集。

1.7 HUK 和 LUK 水解显色底物 S_{2444} 的米氏动力学 参照 Lenich 等方法^[9]进行。

2 结 果

2.1 UK 的分离纯化

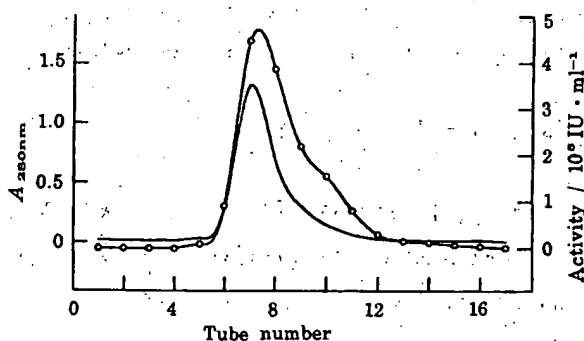


Fig. 1 Benzamidine-Sepharose 6B chromatography of crude UK

Crude UK was applied on the equilibrated Benzamidine-Sepharose 6B column (10×150mm) at the flow rate of 12 ml/h. After washing the column by the equilibration buffer, start to elute UK by elution buffer. Fractions of 2.3ml were collected. The equilibration buffer contained 0.1mol/L NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 , 0.4mol/L NaCl, pH7.0. The elution buffer contained 0.1mol/L NaAc-HAc, 0.4mol/L NaCl (pH4.0)

— A_{280} ○—○ Activity

称 1g 尿激酶粗品, 溶于 50 ml 蒸馏水中, 离心除去不溶物, 上清对起始缓冲液透析, 用 0.45 μm 滤膜过滤。苯甲脒柱用起始缓冲液平衡后上样、平衡, 用洗脱缓冲液洗脱并分部收集, 2.3ml/管。洗脱曲线见 Fig. 1。

合并 5~13 管的组分 (~20ml), 用 Sephadex G-25 除盐, 上 SP 柱。SP 柱预先用平衡缓冲液平衡, 上样后用平衡液平衡至基线稳定, 进行梯度洗脱 (Fig. 2), 收集洗脱峰。根据测活和电泳的结果 (Fig. 3), 收集 Fig. 2 峰 1 (洗脱体积第 65~80ml) 为 LUK, 收集峰 3 (第 145~176ml 为 HUK。SDS-PAGE 鉴定结果 (Fig. 4) 表明, HUK 和 LUK 均呈单一条带, 位置分别在 54kD 和 33kD。

采用考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度, 纤维蛋白平板法测定活力得到纯品的比活, HUK 为

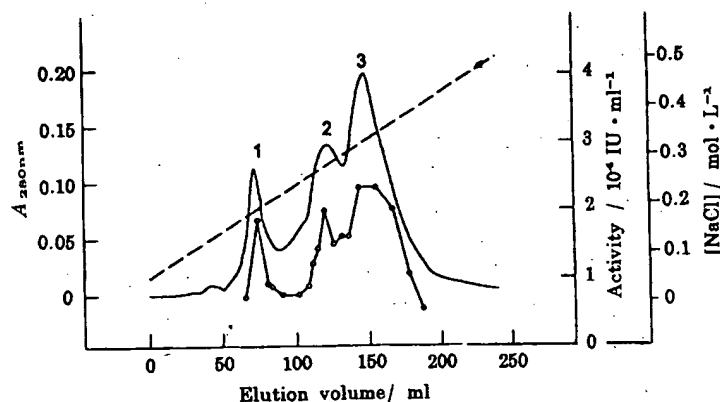


Fig. 2 Protein-Pak SP chromatography of partial purified UK

Partial purified UK was applied on Protein-Pak SP column(10×100 mm)at the flow rate 1ml/min. Buffer A:0.1 mol/L NaAc-HAc,pH5.0,Buffer B:buffer A with 1mol/L NaCl. The column was eluted with a linear gradient from buffer A to 50% buffer B in 240 minutes. Peak 1 is LUK,Peak 2 is the degraded product of HUK and Peak 3 is HUK

— A_{280nm} ; ●—● Activity; --- NaCl

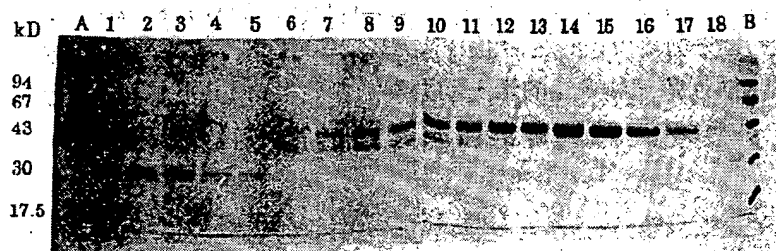


Fig. 3 SDS-PAGE of UK eluted from the Protein-Pak SP column

A and B,Low-molecular-weight protein markers. Fractions 1—4(corresponding to range of 63rd—80th ml elution volume in Fig. 2),6—11(10th—126th ml)and 13—17(139th—176th ml)were LUK,the degraded product of HUK and HUK,respectively

2. 9×10^5 IU/mg 蛋白, LUK 为 3.5×10^5 IU/mg 蛋白. 分离纯化的总结见 Table 1.

2.2 UK 的米氏动力学常数测定

2.2.1 UK 水解 S_{2444} 的 K_m 值测定 实验中测得不同底物浓度下的反应初速度(3 次数据平均值,数据略)按米氏方程 $v = V_m[S]/(K_m + [S])$,用 Marquardt-Levenberg 算法,以 v 对 $[S]$ 作非线性拟合得到下面的拟合结果(Fig. 5):HUK, $K_m = 63.2 \mu\text{mol/L}$, $V_m = 73.2 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; LUK, $K_m = 49.4 \mu\text{mol/L}$, $V_m = 45.8 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

Table 1 The results of UK purification

Step	Total activity /10 ⁵ IU	Specific activity /10 ⁵ IU · mg ⁻¹	Yield (%)	Purification fold
Crude UK	9.78	0.0879	100	
Benzamidine	9.02	0.828	92	9.4
SP/HUK	5.32	2.92	54	33
SP/LUK	1.65	3.53	17	40
SP/Total UK	6.97	3.05	71	35

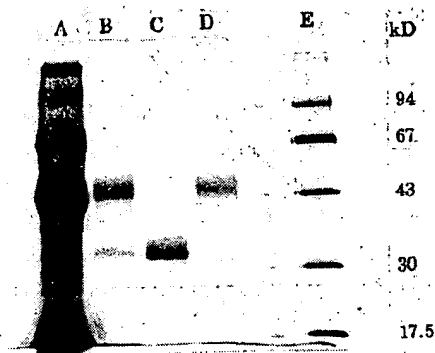


Fig. 4 SDS-PAGE of purified HUK and LUK

A: Crude UK. B: UK eluted from the benzamidine-Sepharose 6B column. C: LUK purified by SP column. D: HUK purified by SP column. E: low-molecular-weight protein markers

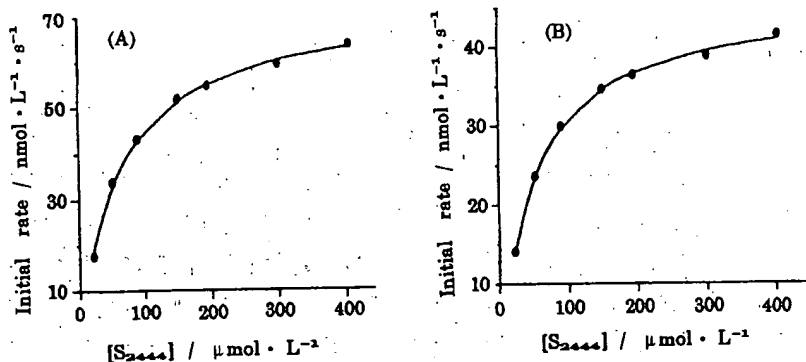


Fig. 5 Kinetics of hydrolysis of S_{2444} by HUK and LUK

(A) HUK (B) LUK

2.2.2 UK 水解 S_{2444} 的 k_{cat} 值测定 实验中测得不同酶浓度下的反应初速度(3 次数据平均值), 得到 $[E]-v$ 数据, 根据 $[S]$ ($375 \mu\text{mol/L}$) 和 K_m 值, 由公式 $V_m = v(K_m + [S])/[S]$, 计算可得到 $[E]-V_m$ 关系(数据略), V_m 对 $[E]$ 作图(Fig. 6), 得到的直线斜率即是 k_{cat} . HUK 的 k_{cat} 值为 15.4 s^{-1} , LUK 的 k_{cat} 值为 13.3 s^{-1} .

2.2.3 HUK 和 LUK 动力学参数的总结和催化效率(k_{cat}/K_m)的比较 见 Table 2.

Table 2 Kinetic constants of HUK and LUK

	$K_m/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	k_{cat}/s^{-1}	$k_{cat} \cdot K_m^{-1}/\mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$
HUK	64	15	0.24
LUK	49	13	0.27

3 讨 论

尿激酶首先以单链的尿激酶原形式从细胞中分泌出来, 经纤溶酶、某些非专一性的蛋白酶或自催化降解, 可成为 54kD 的双链高分子量尿激酶及 48kD 、 33kD 和 32kD 等几种低分子量形式的尿激酶^[5]. 由于尿激酶本身就是一种丝氨酸蛋白酶, 有较强的催化降解作用^[10], 所以在尿激酶的纯化中必须尽量克服其自催化降解及其它的丝氨酸蛋白酶对它的降解作用, 为此除了在纯化过程中采取低温操作及缩短操作时间等方法之外, 我们在实验中发现, 低 pH 值条件可以有效的降低尿激酶的降解作用. 虽然可以在纯化过程中加入丝氨酸蛋白酶的抑制剂如精氨酸、苯甲脒等以减少降解作用, 但这些抑制剂对后续的性质研究造成影响, 故在本工作中未

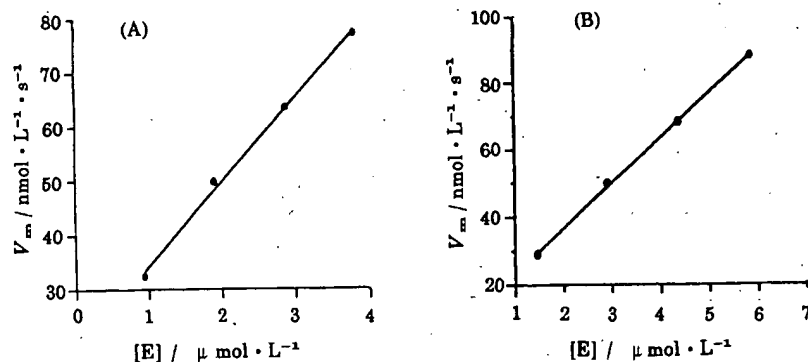


Fig. 6 V_m -[E] plot of hydrolysis of S_{2444} by HUK and LUK

(A) HUK (B) LUK

予采用. 本文采用两步层析分离纯化尿激酶, 得到了纯度较高的 HUK 和 LUK, 比活力分别达到 $2.9 \times 10^5 \text{ IU} \cdot \text{mg}^{-1}$ 和 $3.5 \times 10^5 \text{ IU} \cdot \text{mg}^{-1}$, SDS-PAGE 均显示为一条带. 活力回收率达到 $2.9 \times 10^5 \text{ IU} \cdot \text{mg}^{-1}$ 和 $3.5 \times 10^5 \text{ IU} \cdot \text{mg}^{-1}$, SDS-PAGE 均显示为一条带. 活力回收率达到 70% 以上. 与文献报道值(比活 $1 \times 10^5 \sim 1.8 \times 10^5 \text{ IU} \cdot \text{mg}^{-1}$)^[11~13]相比, 可以说本文的纯化方法是一种简便高效的方法. 我们在实验中还发现尿激酶纯品的稳定性较粗品高, 室温放置一周后在 SDS-PAGE 上仍看不到明显的降解(结果未示出). 我们分析造成这一现象的原因是由于在尿激酶粗品中有其它的蛋白水解酶, 经纯化柱除去这些蛋白酶之后, 增加了稳定性.

同时我们把 HUK 和 LUK 进行完全有效分开, 降低在溶栓治疗中由于 LUK 作用不专一, 毒副作用大引起的易出血的危险. HUK 和 LUK 的比活和纯度的提高, 为 HUK 和 LUK 的动力学性质的研究以及酶和蛋白质的结构与功能的研究提供了有利条件.

米氏方程是假非线性方程, 对于符合米氏动力学的 $[S]$ - v 数据的处理方法很多, 有 Lineweaver-Burk 法 ($1/v$ - $1/[S]$ 作图), Hanes 法 ($[S]/v$ - $[S]$ 作图) 和 Eadie-Hofstee 法 (v - $v[S]$ 作图) 等, 基本原理是将数据线性化以后用最小二乘法求出拟合参数, 由于各种线性化方法处理后的数据点的权不同, 故同一组数据用不同的线性化方法求出的拟合参数实标上是不同的. 本实验中使用 Marquardt-Levenberg 迭代算法, 直接使用米氏方程的原形式, 保证了拟合精密度. 实验测得的 HUK 的 K_m 和 k_{cat} 值 (25°C) 与文献值 (23.5°C : $K_m = 55 \sim 66 \mu\text{mol/L}$; 37°C : $K_m = 72 \sim 80 \mu\text{mol/L}$, $k_{cat} = 23 \sim 26 \text{ s}^{-1}$)^[9,14] 基本一致. 动力学参数测定的结果还表明, LUK 的催化效率 ($k_{cat}/K_m = 0.27 \text{ L} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) 高于 HUK ($k_{cat}/K_m = 0.24 \text{ L} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). 这说明 LUK 对小肽底物的催化能力比 HUK 强. 但在实际临床应用上 LUK 的出血副作用大^[15], 所以可推测 HUK 分子中 A 链结构域特异诱导的 B 链结构域构象对纤溶酶原和纤维蛋白的结合是有一定特异性的.

参 考 文 献

- 1 Van Hinsbergh V, et al. *Haemostasis*, 1988, 18: 307
- 2 Christopher B G, et al. *Drugs*, 1992, 44: 293~325
- 3 David R A, et al. *Can Med Assoc J*, 1992, 146: 1317~24
- 4 Suyama T, et al. *Thromb Haemost*, 1977, 38: 48~52
- 5 De Munk G A W, et al. *Fibrinolysis*, 1990, 4: 1~9
- 6 Deoghy L, et al. *Clin Chim Acta*, 1975, 60: 85~90

- 7 Loffler B M, Kunze H. *Anal Biochem*, 1989, **177**:100~102
- 8 Laemmli U K. *Nature*, 1970, **227**:680~685
- 9 Lenich C, et al. *Thromb Haemost*, 1992, **68**:539~544
- 10 Nobuhara M, et al. *J Biol Chem*, 1986, **261**:225~232
- 11 Lars Holmberg, et al. *Biochim Biophys Acta*, 1976, **445**:215~222
- 12 Stump D C, et al. *J Biol Chem*, 1986, **261**:1267~1273
- 13 孙乐琴, 等. 生物化学与生物物理学报, 1984, **16**:303~306
- 14 Sarubbi E, et al. *Thromb Haemost*, 1989, **62**:927~933
- 15 Edgar H, et al. *Science*, 1989, **243**:51~56

Purification of High-molecular-weight and Low-molecular-weight Urokinase and Kinetic Study

Sun Tian-Xiao, Wang Hong-Mei, Xu Chang-Fa

(The National Laboratory of Protein Engineering and Plant Gene Engineering,
Peking University, Beijing 100871) China

Abstract High-molecular-weight urokinase(HUK)and low-molecular-weight urokinase (LUK) were purified from crude human urokinase by benzamidine affinity chromatography followed by SP ion-exchange chromatography. The specific activity determined by fibrin plate of HUK is 2.9×10^5 IU/mg protein and LUK is 3.5×10^5 IU/mg protein. The total yield of the purification is above 70%. The purified HUK and LUK migrated as single bands of 54kd and 33kd respectively. The kinetic constants of the purified HUK and LUK toward peptide substrate S_{244} were investigated. For HUK, K_m is $64 \mu\text{mol/L}$, k_{cat} is 15 s^{-1} , And for LUK, K_m is $49 \mu\text{mol/L}$, k_{cat} is 13 s^{-1} . The catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) of LUK is slightly higher than that of HUK.

Key words: High-molecular-weight urokinase, Low-molecular-weight urokinase, Purification, Michaelis kinetics

RETURN this loan to:
CAS, POB 3012, Columbus, OH 43210 USA